

## 短波長 UV-LED を利用した清酒酵母の育種

岡久 修己\*1, 池田 絵梨\*1, 中村 怜\*2

### 抄 録

これまでの研究により、主波長 280nm の UV-LED を清酒酵母の育種に利用することで、カプロン酸エチルを高生産し、発酵力の低下が少ない優良な性質を持つ清酒酵母が取得できることが明らかとなった<sup>1)</sup>。本研究では、280nm に加え、255nm, 270nm, 330nm の波長の UV-LED を用いて清酒酵母の育種試験を行い、波長による優良酵母取得効率の違いについて検討を行った結果、波長により優良酵母取得効率に差がある可能性が示唆された。このうち 270nm の UV-LED を用いて育種した 1 株について、実用規模の醸造試験を行った結果、カプロン酸エチル高生産性と、高い発酵力が確認された。

### 1 はじめに

香味良好な清酒を醸造する目的で、新規清酒酵母の育種は、全国各地で盛んに取り組まれている。特に近年は、吟醸酒の香りの主要な成分であるカプロン酸エチルを高生産する清酒酵母が育種され、吟醸酒や純米吟醸酒に利用されている。育種の手法としては、エチルメタンсульフォネート等の薬剤処理、水銀ランプを用いた紫外線照射等による変異株の取得や、酵母の接合による交雑株の取得等が挙げられる。しかしながら、カプロン酸エチルを高生産する清酒酵母は同時に、親株よりも発酵力が低下してしまう場合が多く、カプロン酸エチル高生産性と高い発酵力を併せ持った清酒酵母の育種が課題となっている。

これまでの研究により UV-LED を光源とする 280nm の紫外線を照射することで、カプロン酸エチルを高生産し、発酵力の低下が少ない優良な性質を持つ清酒酵母が育種できることを見出し<sup>1)</sup>、得られた 2 種類の清酒酵母について「LED 夢酵母」として実用化している。本研究では、280nm に加え、330nm, 270nm, 255nm の波長の UV-LED を使用し、波長による優良酵母取得効率への影響を検討するとともに、さらなる優良酵母の取得を図った。

### 2 実験方法

#### 2・1 供試菌株および培地

親株としてきょうかい901号酵母 (K-901) を使用した。培地として YPD 培地 (1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%ブドウ糖)、麴汁培地 (乾燥

麴に4倍量の水を加えて糖化し、濾過後、Brix10%, pH4に調整した培地。乾燥麴には徳島製麴社製の G-50 (精米歩合50%「山田錦」) を用いた。) およびアルコール脱水麴添加培地<sup>2)</sup> を用いた。

#### 2・2 微生物育種用UV-LED照射装置

微生物育種用UV-LED照射装置は、既報<sup>1) 3)</sup>で試作した装置を使用し、主波長330nm, 280nm, 270nm, 255nmのLED光源を用いた。各UV-LED光源について、UV-LEDへ流れる電流値(A)を調節することで、全ての波長で光放射強度比が一定になるように制御した。

#### 2・3 セルレニン耐性変異株の分離

きょうかい901号酵母を、YPD液体培地を用い、28℃で2日間振盪培養後、集菌洗浄し、生理食塩水にて約 $1 \times 10^7$  cells/mlの菌懸濁液を調製した。この菌懸濁液6mlを直径60mmのシャーレに入れ、微生物育種用UV-LED照射装置を用いてUV-LEDを光源とする紫外線を、シャーレの菌懸濁液表面から50mmの距離で、255nmは1分、270nmは2分、280nmは5分、330nmは60分それぞれ照射し、Ichikawaら<sup>4)</sup>の方法を参考にセルレニン耐性株の分離を行った。すなわち、紫外線照射後の菌懸濁液を12.5μMセルレニン含有YPD寒天平板培地に塗布し、28℃で4日間培養後、生育した酵母コロニーを単離した。

#### 2・4 アルコール脱水麴添加培地による発酵試験

アルコール脱水麴添加培地による発酵試験は、斎藤らの方法<sup>2)</sup>に準拠した。YPD液体培地を用い25℃

\*1 食品・応用生物担当, \*2 電子技術担当

で3日間培養した酵母培養液を、アルコール脱水麴培地に添加し、15℃で20日間培養した。培養後に、炭酸ガス減少量を測定し、培地上清について、香气成分の測定を行った。

## 2・5 200g規模清酒小仕込試験

表1に示した仕込み配合で総米200gの清酒小仕込み試験を行った。酵母の前培養は、アルコール脱水麴添加培地で、25℃、3日間行った。掛米はα化米YA-50（精米歩合50%「山田錦」）、麴は乾燥麴G-50（精米歩合50%「山田錦」）（いずれも徳島製麴社製）を用いた。品温は、添15℃、仲10℃、留6.5℃とし、その後9日目に最高品温が10.5℃となるように約0.5℃/日ずつ品温を上昇させ、以後上槽までの温度を維持した。留以降の炭酸ガス減少量が58g以上となった時点で、遠心分離により上槽した。

表1 総米200g清酒小仕込み試験仕込み配合

	水麴	初添	仲添	留添	計
蒸米(g)	-	28	46	84	158
麴米(g)	12	-	14	16	42
汲水(ml)	72	-	98	190	360

## 2・6 実用規模清酒醸造試験

県内酒造企業の協力を得て実施した。麴米、掛け米ともに「吟のさと」（精米歩合53%）を使用した。仕込み配合を表2に示した。もろみ経過により追い水を施し、最終の汲水歩合は150%とした。仕込温度は、初添12℃、仲添10℃、留添8℃とした。最高温度は12℃とし、自動もろみ搾機により上槽した。

表2 実用規模清酒醸造試験仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
蒸米(kg)	28	68	136	181	413
麴米(kg)	14	19	32	37	102
汲水(l)	51	94	218	366	729

## 2・7 成分分析

培地上清、もろみおよび製成酒の日本酒度は、京都電子工業社製振動式密度計DA-640を用いて、酸度およびアミノ酸度は国税庁所定分析法に従い分析した。アルコール分は、日立製作所社製高速液体クロ

マトグラフ655A-11（使用カラム：BioRad社製発酵モニター用カラム）を用いて測定した。香气成分の測定は、パーキンエルマー社製ガスクロマトグラフClarus500（使用カラム：Agilent社製DB-Wax）を用いたヘッドスペース法にて行い、成分の定量は内部標準法に従った。内部標準液として、カプロン酸メチルを用いた。

## 3 結果および考察

### 3・1 清酒酵母育種試験

前報<sup>3)</sup>で定めた条件、すなわち照射距離 50mm、照射時間 255nm は 1 分、270nm は 2 分、280nm は 5 分、330nm は 60 分で、きょうかい 901 号に紫外線を照射し、1304 株のセルレニン耐性酵母を取得した。それぞれの波長によって取得されたセルレニン耐性酵母の数を図 1 に示した。セルレニン耐性酵母取得数は 270nm が最も多く、330nm はその半分以下であった。

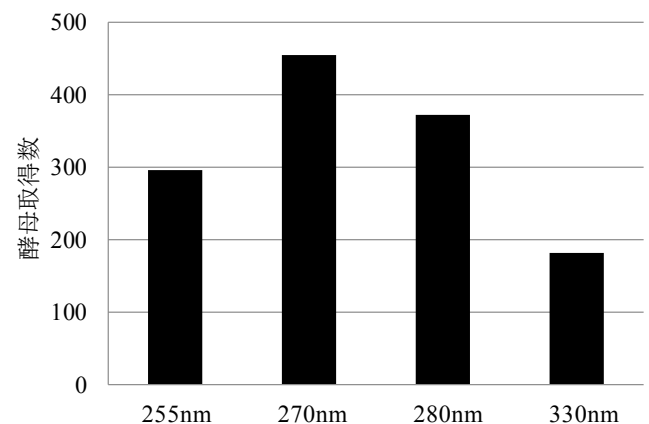


図1 各波長におけるセルレニン耐性酵母取得数

### 3・2 アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験

得られたセルレニン耐性酵母について、アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験を行い、炭酸ガス減少量、培地上清の香气成分の分析を行った結果、カプロン酸エチルを親株である K-901 の 3 倍以上生産するカプロン酸エチル高生産株が、34 株得られた。カプロン酸エチル高生産株の発酵試験結果を表 3 に示した。カプロン酸エチル高生産株の取得数は、255nm 照射時は 8 株、270nm 照射時は 11 株、280nm 照射時は 9 株、330nm 照射時は 6 株であり、セルレニン耐性株取得数と同様に 270nm 照射時が最も多く、330nm が最も少なくなった。カプロン

酸エチル高生産株のうち炭酸ガス減少量が K-901 と同等以上の株は、255nm 照射時は 1 株、270nm 照射時は 5 株、280nm 照射時は 3 株、330nm 照射時は 5 株であった。

表 3 アルコール脱水麹培地を用いた発酵試験結果

菌株	照射波長 (nm)	炭酸ガス 減少量 (g)	カブロン酸 エチル (ppm)
K-901		4.7	0.6
4264	255	4.5	2.4
4276	255	4.5	2.3
4310	255	4.3	2.2
4327	255	4.0	1.7
4330	255	4.0	1.8
4410	255	3.9	2.3
4487	255	4.5	2.8
7811	255	4.9	3.2
4196	270	4.8	2.0
4206	270	4.7	2.7
4226	270	4.8	2.4
4240	270	4.5	1.8
4251	270	4.7	2.4
4368	270	4.9	2.3
4656	270	4.1	1.8
4949	270	4.6	3.3
7976	270	4.4	3.4
8007	270	3.7	1.8
8009	270	4.2	1.9
4163	280	4.5	1.9
4425	280	4.4	2.5
6279	280	4.0	1.9
7189	280	4.7	3.5
7367	280	4.3	3.8
8081	280	4.8	3.7
8085	280	4.8	4.2
8131	280	3.8	2.0
8133	280	4.1	2.5
4335	330	4.8	2.5
4357	330	4.9	2.2
4363	330	4.9	2.2
4371	330	4.6	2.5
8172	330	4.9	3.2
8181	330	5.0	2.4

### 3・3 清酒小仕込み試験

アルコール脱水麹培地を用いた発酵試験で選抜したカブロン酸エチルを高生産し、炭酸ガス減少量が親株と同等以上の14株について、200g規模の清酒小仕込み試験を行った。小仕込み試験の結果を表4に示した。カブロン酸エチルはNo.8181株を除いた13株でK-901の4倍以上となった。酢酸エチル、酢酸イソアミル、イソアミルアルコールは全ての株でK-901と比較して低下した。酸度は、K-901と比較してNo.7811株のみ高くなったが、他の13株は低下した。もろみ日数、日本酒度、アルコール度といった発酵力の指標となる分析値については、菌株によりばらつきが見られた。もろみ日数31日以内、日本酒度-1.8以上、アルコール度17.5%以上の株を発酵力の低下が少ない優良酵母として選抜したところ、255nm照射では該当株が無く、270nm照射ではNo.4196、4206、4368の3株、280nm照射ではNo.7189、8081の2株、330nm照射ではNo.4335、4357、8172の3株が得られた。255nm照射では、カブロン酸エチルを高生産し、発酵力が高い優良酵母の取得効率が他の波長と比較して、劣っており、330nm照射では、カブロン酸エチル高生産株の取得効率は他の波長と比較して劣るものの、カブロン酸エチル高生産株に占める高発酵力株の割合が高いことから、波長により、優良酵母取得効率に差が見られる可能性が示唆された。選抜した優良酵母のうちK-901と比較して、カブロン酸エチルを約4倍生産し、同じもろみ日数で、日本酒度とアルコール度が高く、酸度が低いNo.4206株を実用規模の醸造試験に用いた。

### 3・4 実用規模醸造試験

県内酒造企業の協力を得て、No.4206株を総米約500kg規模の純米吟醸酒の醸造に用いた。280nmのUV-LEDを用いて育種し、「LED夢酵母」として実用化されているNo.3643株<sup>1)</sup>を用いて、同じ酒造企業で同規模の醸造を行い製成した清酒と比較した結果を表5に示した。No.4206株はNo.3643株と比較してカブロン酸エチル生産量はやや低いものの、7.7ppmとなり、製成酒は華やかな吟醸香を有していた。また、もろみ日数は2日短く、アルコール度が高いことから、No.4206株はNo.3643株よりも発酵力が強く実用化可能な酵母であった。

表4 200g 規模清酒小仕込み試験結果

菌株	照射波長 (nm)	もろみ日数 (日)	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	日本酒度	アルコール 度 (%)	酢酸エチル (ppm)	酢酸イソ アミル (ppm)	イソアミル アルコール (ppm)	カプロン酸 エチル (ppm)
K-901		29	2.4	1.0	1.2	18.0	165	3.4	178	0.9
7811	255	30	2.6	0.9	-7.3	18.2	71	3.0	108	3.8
4196	270	31	2.1	1.1	-1.6	18.3	126	1.8	160	4.7
4206	270	29	1.9	0.9	1.6	18.2	119	2.1	161	4.0
4226	270	35	1.9	1.6	-10.6	17.3	89	1.3	121	10.8
4251	270	37	2.2	1.3	-15.4	16.3	103	2.2	156	8.7
4368	270	31	2.0	1.0	1.4	18.5	96	1.9	144	5.0
7189	280	28	2.2	0.9	-1.0	18.0	59	2.7	102	5.4
8081	280	29	2.1	0.7	0.8	17.9	78	2.4	108	5.1
8085	280	36	1.8	1.2	1.8	17.7	49	3.1	102	8.3
4335	330	29	2.0	0.9	1.6	18.1	117	2.0	149	4.3
4357	330	29	1.9	1.0	-1.2	18.4	131	2.3	159	3.8
4363	330	32	1.9	1.2	-0.7	17.9	122	2.2	154	5.0
8172	330	30	2.1	0.8	0.4	17.6	93	2.5	106	5.5
8181	330	36	1.8	0.9	-1.3	18.0	69	2.8	130	2.2

表5 実用規模醸造試験結果

菌株	照射波長 (nm)	もろみ日数 (日)	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	日本酒度	アルコール 度 (%)	酢酸エチル (ppm)	酢酸イソ アミル (ppm)	イソアミル アルコール (ppm)	カプロン酸 エチル (ppm)
3643	280	29	1.6	0.9	2.0	16.7	31.6	0.7	133	9.5
4206	270	27	1.7	1.2	1.0	17.1	36.2	1.4	106	7.7

#### 4 まとめ

主波長 255nm, 270nm, 280nm, 330nm の LED を光源とする紫外線照射により 1304 株のセルレニン耐性株を取得した。セルレニン耐性株について、アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験を行い、カプロン酸エチルを高生産し、炭酸ガス減少量が親株と同等以上の株を 14 株選抜した。選抜株を用いて 200g 規模の清酒小仕込試験を行ったところ、カプロン酸エチルを高生産し、発酵力の低下が少ない株が、270nm 照射で 3 株、280nm 照射で 2 株、330nm 照射で 3 株取得され、255nm 照射では取得できなかった。このことから、波長により優良酵母取得効率に差が見られる可能性が示唆された。このうち、270nm の UV-LED を用いて取得した No.4206 株を用いて実用規模の醸造試験を行ったところ、「LED 夢酵母」として実用化されている No.3643 株と比較して、カプロン酸エチル生産量はやや劣るものの、発酵力は強く、実用化が十分可能な酵母であった。

#### 参考文献

- 1) 岡久修己, 宮崎絵梨, 日開野輔, 中村怜. UV-LED を用いた清酒酵母の育種. 徳島県立工業技術センター研究報告, 2015, 24, p. 23-25.
- 2) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章. アルコール脱水麴を用いる培地による優良酵母の分離とその性状. 醸協, 1992, 87, p. 915-921.
- 3) 岡久修己, 中村怜. UV-LED を利用した微生物育種用機器の開発に関する調査研究. 徳島県立工業技術センター研究報告, 2016, 25, p. 43-45.
- 4) Ichikawa, E.; Hosokawa, N.; Hata, Y.; Abe, Y.; Suginami, K.; Imayasu, Y. Breeding of Sake Yeast with Improved Ethyl Caproate Productivity. Agric.Biol.Chem, 1991, 55, p. 2153-2154.